

A „Globális regulátor mutációknak mint az attenuálás lehetőségének vizsgálata *Escherichia coli*-ban”

című támogatott kutatás fő célja az volt, hogy olyan regulációs mechanizmusoknak a virulenciára kifejtett hatását mérjük fel, amelyek egyszerre három, vagy akár több virulencia faktor expresszióját szabályozzák. Mivel ezek a mutációk bizonyos tulajdonságok kifejeződését pozitívan, másokét negatívan befolyásolhatják, *in vitro* rendszerekben külön-külön felmértük az egyes virulencia faktorokra kifejtett hatást, valamint egérkísérletekben vizsgáltuk a mutációknak a virulencia eredőjére gyakorolt befolyását. Célunk volt továbbá az is, hogy az attenuált származékoknak, mint lehetséges vakcinajelölt törzseknek az immunizáló hatását felmérjük.

A globális regulátor szekvenciák közül a *leuX*, *rfaH*, *recA* gének mutációs hatását vizsgáltuk részletesen. A pályázati periódus utolsó szakaszában nyílt lehetőségünk az *lrhA* gén funkciójának tanulmányozására. Ezzel kapcsolatban a periódus befejeztéig csak a közönséges fimbria és a csillóképzés expressziójára gyakorolt hatást tudtuk vizsgálni, valamint összehasonlító virulencia vizsgálatokat végeztünk.

A vizsgálatok és eredmények bemutatása:

Az *Escherichia coli* törzsek esetében a curli-fimbria egy olyan felületi járulékos faktor, amely az élő és élettelen környezetben a felületekhez tapadást, ezáltal a kolonizációt segíti elő. Természetes húgyúti *E. coli* izolátumokon, különböző regulációs mutánsokon (*leuX*, *recA*, *rfaH*), és transzkomplementált származékaikon a tenyésztési paramétereket (inkubációs idő, hőmérséklet, O₂ tenzió, a táptalaj összetétele) változtatva vizsgáltuk azok befolyását is a curli fenotípusos kifejeződésre. A curli expresszióját elektronmikroszkópos készítményeken, fajlagos immunsavóval (ELISA) és a biofilm képzés képessége alapján kvantitatíve is felmértük. Elektronmikroszkópos vizsgálattal a törzsek 58 %-a, fajlagos immunsavóval végzett ELISA vizsgálattal 52 %-a esetén állapítottuk meg, hogy a szokványos fimbria típusoktól eltérő, dús hajfonatra emlékeztető „curli” fimbriát termelnek. A struktúrális génre fajlagos primerekkel az összes törzs esetében pozitív reakciót kaptunk. Az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy bár a struktúrális gén mindegyik törzsben jelen van, az expresszió csak az izolátumok egy részében következik be. A vizsgálatokat az expresszió szempontjából optimálisnak talált, 1 % tryptont tartalmazó sómentes táptalajon tenyésztett baktériumokkal végeztük. Mivel a direkt elektronmikroszkópos vizsgálattal találtunk olyan törzseket, amelyek az ELISA rendszerben negatívak voltak, a „prototípus” antigenitású curlitól eltérő antigenitású curli előfordulásával is számolnunk kell. Ez azt jelenti, hogy a kimutatás megbízható eszköze az elektronmikroszkópos vizsgálat. Globális regulátor génekben történt mutációk esetében a *leuX* gén kiiktatása a curli szintézist negatívan befolyásolta, a génfunkció helyreállítása a curli-képzést az eredeti szintre állította vissza. A *recA* és *rfaH* globális regulátor gének kiiktatása a curli-képzést nem befolyásolta. Az expresszió termoregulált, testhőmérsékleten kevésbé kifejezett, mint 30 °C-on. Ez előnyt jelenthet a maghőmérsékletnél alacsonyabb hőmérsékletű területek kolonizációjában, mint pl. felszíni sebek, vagy húgyúti fertőzést megelőzően a külső nemiszervek. Emellett a kifejeződés jelentősen függ a táptalaj összetételétől. A bakteriológiai diagnosztikában általában használatos táptalajokon a curli nem fejeződik ki, ez magyarázhatja a többi fimbriánál jóval későbbi felfedezését. A fent említett optimális összetételű táptalajon a pozitív kultúrák erősen kötik a kongóvrös festéket, ami a megjelenés markereként hasznosítható. Az expresszió dinamikájára jellemző, hogy a stacioner szaporodási fázisban a legkifejezettebb. Rho szigma

faktor negatív mutánssal végzett vizsgálataink ennek a stacioner fázisban jelentős stressz-válasz regulátornak az expressziót fokozó szerepére utalnak. A műanyag felületen bekövetkező biofilm képzés az RfaH termék hiányában erősebb volt, mint a vad törzsek esetében. Ez feltehetően az LPS- és toksszintézis zavara következtében megnövekedett felszíni hidrofob tulajdonságra vezethető vissza. A mutánsok szérumrezisztenciája is csökken, ami szintén a két felszíni struktúra képzésében bekövetkezett hiányosságnak köszönhető.

Következő vizsgálatsorozatunk alanya az újszülöttkori agyhártyagyulladás okozó, K1 tokantigénnel rendelkező de nem hemolizáló *E. coli* törzs volt. Ezen törzs K1 deficiens mutánsa és a *recA* mutánsa (amely egyben K1 deficiensnek is bizonyult) egerekben jelentősen csökkent virulenciát mutatott. Megvizsgáltuk, hogy a *recA* származék hogyan viselkedik egyéb virulencia tulajdonságok kifejezése tekintetében. A mutáció nem befolyásolta a törzs biokémiai tulajdonságait, tápanyagigényét és antibiotikumokkal szembeni érzékenységét. Rajzásvizsgálattal a mutáns mozgáskészségének megszűnését, elektronmikroszkópos készítményeken pedig a csillóképzés hiányát mutattuk ki. Vaskelátort tartalmazó táptalajon a mutáns a vad törzshöz hasonló módon növekedett, ami a sziderofor képzés képességének megtartását bizonyítja. Gombaagglutinációs és haemagglutinációs reakciókkal a közönséges fimbria képzésének elmaradását igazoltuk. A *recA* mutáns a humán szérum baktériumölő képességével szembeni ellenálló képességét is elvesztette. Az ismertetett adatok a RecA fehérje globális regulátor szerepét bizonyítják az újszülöttkori meningitist okozó *E. coli* esetében, ami az *in vitro* rendszerekben kimutatható változások mellett a különböző egérkísérletekben (letális dózisok, tüdőtoxicitás, organotorpia) mért virulencia csökkenésében is megnyilvánul.

Az *E. coli* 536 izolátum esetében a húgyúti fertőzések szempontjából egyik legjelentősebb virulencia faktor, az alfa-hemolizin termelés szerepét vizsgáltuk. Ez a törzs két teljes alfa-hemolizin operont hordoz, amelyek ki is fejeződnek. Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a két operon által kódolt hemolizin mennyiségileg nem egyformán fejeződik ki, és a két hemolizin fajlagos aktivitása sem egyforma. Jelen OTKA periódusban az operonok „upstream régióját” klónoztuk és szekvenáltuk. A vizsgálatok a két upstream szekvenciában bázis különbségeket igazoltak. A régiók kicserélése a hemolizin operonok kifejeződését úgy befolyásolta, hogy a jobban kifejeződő operon „upstream” régiója a gyengébben kifejeződő operon expresszióját fokozta, és fordítva. A régiók kicserélése a termelt hemolizinek specifikus aktivitását nem befolyásolta. A specifikus aktivitásban talált különbségek okának felderítésére a hemolizinek pórusformáló képességét hasonlítottuk össze. A nagyobb specifikus aktivitással bíró hemolizin molekula stabilabb, hosszabb ideig nyitott pórusokat hozott létre liposzóma membránokon. Annak bizonyítására, hogy a nagyobb specifikus aktivitás a stabilabb pórusokkal függ össze, további vizsgálatok szükségesek. Igazoltuk a *leuX* és *rfaH* mutációk virulenciát csökkentő szerepét ezen húgyúti kórokozó *E. coli* esetében is. Az *rfaH* mutáns tokot sem termelt, továbbá szomatikus antigén szempontjából R mutánsnak bizonyult. Azt is kimutattuk, hogy a kolonizációs faktorokat (közönséges, S- és Prf-fimbria) a mutánsok is képezik. Így az aszcendáló koinfekciós kísérletekben észlelt azon megfigyelésünk, hogy a vad törzs a 100-szor nagyobb dózisban adott *rfaH* mutánst túlnöve okoz fertőzést, nem a kolonizációs faktorok hatására, hanem a tok és lipopoliszaharid képzésben és hemolizin termelésben megnyilvánuló különbségekre vezethető vissza. A *recA* mutáció ugyanakkor a törzs virulenciáját nem befolyásolta. Terveztük a mutációk IL-6 és IL-8 szintézis indukcióra gyakorolt hatásának vizsgálatát sejtenyészeteken. Mivel a citokin indukcióról közben mások bebizonyították, hogy a bakteriális adhézió következménye, ez

pedig a mutáció hatására nem változott, a mutációnak a citokin indukcióra gyakorolt hatását vizsgálni indokát vesztette.

Az *Escherichia coli* alpha-haemolysinje (HlyA) mellett egy újabb haemolysin típus, a „silent haemolysin”(SheA) vált ismertté az utóbbi években. Ennek virulencia funkciójáról adatok még nem állnak rendelkezésre. Mielőtt virulencia vizsgálatokat terveznénk, felmértük azt, hogy előfordulási gyakoriságát tekintve ez a haemolysin egyáltalán lényeges tényezőként számításba jöhet-e. 486 húgyúti *E. coli* izolátum vizsgálata során azok 47,1 %-át találtuk SheA pozitívnak. Ez a magas arány arra utal, hogy ezne utóbbi haemolysin szerepét is indokolt vizsgálni a húgyúti *E. coli* fertőzésekben. Ugyanennek a vizsgálatsorozatnak egy figyelemre méltó eredménye, hogy egyetlen olyan törzs sem fordult elő, amely egyidejűleg *sheA* és *hlyA* géneket is hordozott volna. Hogy egy esetleges antagonizmus áll-e fenn a két gén horodozása között, azt további vizsgálatok dönthetik el. Ugyancsak érdemesnek tartjuk a *sheA* pozitív törzs virulenciáját izogén negatív származékával összehasonlítani.

Egy további vizsgálatosorozatban enterohaemorrhagiás *E. coli* törzs spontán antibiotikum rezisztens mutánsai esetében a mutációk pleiotrop jellegét figyeltük meg. A mutációk a baktérium motilitását és egérkísérletekben mért virulenciáját is csökkentették. Az érintett fenotípusok közös regulációs befolyás alatt lehetnek, de ezt további kísérletekkel szükséges bizonyítani, vagy kizárni.

Az adhezív fimbriák funkcionális peptidszekvenciáinak azonosítására a fág display módszert használtuk. A módszer laboratóriumunkban történő beállításához először a *Y. pestis* Pla fehérjéjének laminin kötő régióit térképeztük fel (biztonsági okokból a Pla expressziója *E. coli*-ban történt). A módszer beállítása után olyan fágokat kerestünk, amelyek az asialoGM1-hez és a CTH-hoz (az *E. coli* F1C fimbria receptorai) és IV-es típusú kollagénhez (a P és S fimbriák matrix receptorát hordozó molekulája) mutattak nagy affinitást. Egy fág a WSLTPA heptapeptid szekvenciával mind a három célmolekulához nagy affinitással kötődött jelezve, hogy ez egy oligoszacharid kötő konszenzus szekvencia lehet. Más szekvenciákat kifejező fágok csak vagy az asialoGM1-hez (VVSVSPI és YPYIPTL), vagy a IV-es típusú kollagénhez (YSGFPNA, NSELTTA, AQSWAMA és SHSAHIF) kötődtek. Ezen peptid szekvenciák további vizsgálata adhat választ arra a kérdésre, hogy alkalmazhatók-e blokkoló ágensként a fimbriák által közvetített bakteriális kolonizáció gátlására.

Az adhéziós-penetrációs kísérletekből származó reagensek felhasználásával tovább vizsgáltuk a *Yersinia pestis* plazminogén aktivátorának adhéziót-penetrációt elősegítő szerepét. Megállapítottuk, hogy a plazminogén aktivátor a baktériumok penetrációs készségét nagy mértékben fokozza. A penetrációs folyamatban igazoltuk a citoszkeleton átrendeződés jelentős szerepét, ami kifejezett actin polimerizációhoz vezet. Emellett adatokat szolgáltatunk a folyamatok során lejátszódó jelátviteli mechanizmusokra. Tirozin kinázok, Rho GTP-áz és 5-lipoxigenáz származékok szerepét bizonyítottuk a penetrációs folyamatban.

Extraintestinalis fertőzést okozó *Escherichia coli* törzsek esetében megvizsgáltuk a vad izolátumok, regulációs mutánsaik és transzkomplementált származékaik megtelepedési képességét az egerek bélcsatornájában orális bevitel után. A megtelepedési képességet uropathogén és újszülöt-kori fertőzést okozó, valamint egy probiotikumként forgalmazott törzs esetében is tanulmányoztuk. A globális regulátor *leuX* és *rfhA* gének mutációja a kolonizációs képességet szignifikáns mértékben csökkentette. Az *rfhA* génnel

transzkomplementált negatív származékok megtelepedési képességét a génfunkció helyreállítása a vad törzsek szintjére állította vissza. Mivel az *rfaH* gén számos tulajdonság kifejeződését szabályozza, az általa szabályozott struktúrális gének tekintetében külön-külön egyedi mutánsokat is megvizsgáltunk. Ezen kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a tokantigén nem, de a felszíni lipopoliszacharid molekula jelenléte szükséges a megtelepedési készséghez. A származékok enterális kolonizáló képességének csökkenése a fenti gének szerepére utal abban, hogy az *E. coli* a kommenzális bélflóra részeként az extraintestinalis fertőzések rezervoárjaként szerepeljen.

Az *rfaH* mutáció a baktériumok adhéziós fimbria képzését és tenyésztett colon-eredetű sejtekhez való adhézióját nem befolyásolta. Ez arra utal, hogy az *in vivo* megtelepedési képességben a lipopoliszacharida molekula hiányából következő ártalom játszik szerepet. A vad törzsek, a mutánsok és a transzkomplementált származékok epeérzékenységeinek összehasonlítása alapján arra következtetünk, hogy a mutánsok epeérzékenysége azok túlélési képességét a bélcsatornában csökkenti. Ezáltal tartós kolonizációjuk már a túlélési képesség hiánya miatt sem következhet be a bélcsatornában. Orális koinfekciós kísérleteket is végeztünk a vad törzsekkel és mutánsaikkal. Mint az várható volt, a vad törzsek orális bevitel után a mutánsokat az egerek bélcsatornában hamar túlnőtték.

Mivel a mutánsok epeérzékenység mellett szérumszenzitívekké is váltak, valamint sziderofor receptor deficiensnek mutatkoztak, ez meghatározta azt, hogy intravénás egérfertőzés után a vérből és a belső szervekből hamar eliminálódtak olyan szubletális dózis adása esetén, amely a vad törzs esetében ugyan a vérből néhány napon belül eliminálódott, de a belső szervekből - leggyakrabban a vesékből - még két héttel a fertőzés után is kimutatható volt. A vesékben gyakran multiplex tályogok megjelenését figyeltük meg, amelyekből csak a vad törzs volt kitenyészthető koinfekciós vizsgálat esetén is. Hasonlóképpen, szubletális dózissal megfelelő baktériummennyiség intravezikulális bevitel után a vad törzs a veséket elérő aszcendáló fertőzést okozott, míg a mutánsok az egerek egy részében a hólyagból (a bevitel helyéről) voltak csak kimutathatók a vad törzsnél jóval alacsonyabb mennyiségben a kísérlet lezárásakor. A hólyagban való kimutathatóságot magyarázza, hogy itt a komplement ölő hatásával nem kell számolni, valamint a *leuX*, *rfaH*, *recA* és *rpoS* mutánsok fimbria termelést tekintve nem váltak negatívvá. Ennek következtében a bevitt baktériumok egy részének megtapadása és túlélése a hólyaghámon már pozitív tenyésztési lelethez vezethet. A fertőzést követő IL-6 szint alakulására vonatkozóan időközben irodalmi adatok jelentek meg, ezért annak vizsgálata okafogyottá vált.

Egyébként azonos virulencia faktorokkal rendelkező, de O:K:H antigenitás szempontjából eltérő vad *E. coli* törzsek virulenciájában jelentős különbségeket találtunk intravénás és intravezikulális egérmodellekben. Ez a K1 és K5 virulencia faktor tokantigénekén kívül más felületi antigének estében is jellemző. A különbségek részben magyarázhatók azzal, hogy egyes „O” antigének szérumrezisztenciát biztosítanak, mások pedig nem. Ez bizonyos tokantigének esetében is így van. Az általunk tanulmányozott O6:K15:H31 antigenitású *E. coli* törzs esetében a K15 jelű tokantigén az aszcendáló húgyúti fertőzésben jelentős szerepet játszik egérmodellben, ugyanakkor a szérumrezisztenciában nincs szerepe.

Az RfaH virulencia szerepét *Salmonella enterica*-ban is vizsgáltuk. A *S. enterica* serovar Typhimurium SL1344 törzs *rfaH* mutánsát állítottuk elő. Egerek intraperitoneális és intragastricus fertőzése során ez szignifikánsan alacsonyabb virulenciával rendelkezett, mint a vad törzs. Az *rfaH*-val történő transzkomplementálás a virulenciát helyreállította. A mutánsal végzett orális immunizálás védő hatású volt a vad törzzsel végzett fertőzéssel szemben. Th1-közvetített immunválaszt mutatunk ki főként az IgG1 és IgG2a izotípusok részvételével. Az *in*

vitro reaktivitás nemcsak a homológ SL1244 törzzsel szemben, hanem más *S. enterica* serovariánsokkal és *S. bongori*-val szemben is kimutatható volt.

A *S. enterica* virulencia faktorai közül az RfaH-nak csak az LPS-re gyakorolt hatása volt ismert. Eredményeink azonban arra utalnak, hogy – az *E. coli*-hoz hasonlóan – ez a molekula más tényezők regulációjában is szerepet játszhat. Ezt a feltételezést támasztja alá az, hogy az RfaH hiányában az intracelluláris szaporodási képesség jelentősen csökkent.

A pályázat utolsó évében részt vettünk egy kooperációs munkában, amely az *lrhA* gén negatív regulátor szerepét igazolta. E gén hiányában fokozódik az *E. coli* közönséges fimbriájának temelődése és csillóképzése. A felületi organelumok túltermelése a biofilm képzést is pozitívan befolyásolja. Egérkísérletekben ezen negatív regulátor funkciójának kikapcsolása a virulenciát mérhető módon nem befolyásolta.

Az *E. coli* virulenciájának evolúcióját modelleztük egy teljes pathogenitási sziget átvitelével húgyúti kórokozó törzsből K-12-es törzsbe. A K-12 törzsből sikeres retranszfert hajtottunk végre az eredeti törzs pathogenitási szigetett elvesztett származékába.

Mivel céljaink között szerepelt annak a vizsgálata, hogy a globális regulátor génben mutáns attenuált törzsek alapját képezhetik-e vakcina jelölt törzseknek, immunizációs kísérleteket is végeztünk. Mivel a *recA* és *lrhA* mutációk virulencia csökkenéshez nem vezettek, az ilyen származékokat nem, csak a *leuX* és *rfaH* mutánsokat tudtuk alkalmazni az immunizációs kísérletekben. Húgyúti kórokozó és újszülött kori meningitist okozó *E. coli* attenuált származékokkal immunizált egereket a homológ vad törzzsel fertőztük. Megállapítottuk, hogy homológ rendszerben szignifikáns protektív hatása van az immunizációnak. O:K antigenitás szempontjából heterológ törzsekkel szemben az immunizálás védő hatást nem váltott ki.

A támogatott kutatások eredményeit összesen 27,85 impakt faktort eredményező közleményben foglaltuk össze.